



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월27일
(11) 등록번호 10-1832082
(24) 등록일자 2018년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/336 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/336 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0001841
(22) 출원일자 2017년01월05일
심사청구일자 2017년01월05일
(56) 선행기술조사문헌
Food and Chemical Toxicology. vol.50,
pp.3336-3342 (2012.06.23.).

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
최일환
부산광역시 남구 분포로 111, 114동 904호 (용호
동, 엘지메트로시티)
박세광
부산광역시 남구 분포로 113, 235동 2301호 (용호
동, 엘지메트로시티)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 7 항

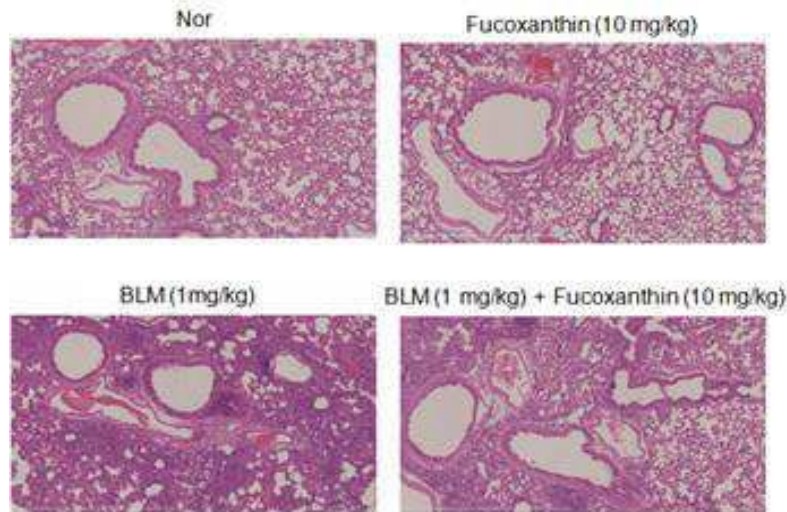
심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 함유하는 폐섬유화증 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 푸코잔틴을 유효성분으로 함유하는 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것으로, 상기 푸코잔틴은 특정 효소의 인산화를 억제하여 신호 전달 경로를 차단함으로써 폐섬유화증 표지 단백질의 발현 및 사이토카인의 분비를 억제할 수 있으므로, 상기 푸코잔틴을 포함하는 약학 조성물 및 건강기능식품 조성물은 폐섬유화증을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/314 (2013.01)

(72) 발명자

오정환

부산광역시 남구 분포로 111, 106동 1006호 (용호
동, 엘지메트로시티)

정원교

부산광역시 남구 분포로 111, 141동 2004호 (용호
동, 엘지메트로시티)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525005409

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발

연구과제명 (핵심과제2)해양 생물 유래 생체 진단 치료용 적용 소재 선정 및 효능 검증

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 함유하며, 폐섬유화증 표지 단백질인 α -SMA, 콜라겐-1(Collagen-1) 및 피브로넥틴(fibronectin)의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 특발성 폐섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

푸코잔틴을 유효성분으로 포함하는, 인 비트로(in vitro)에서 α -SMA, 콜라겐-1(Collagen-1) 및 피브로넥틴(fibronectin)의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 시약 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 푸코잔틴은 p38, AKT, smad2 및 smad3의 인산화를 억제함으로써 폐섬유화증 표지 단백질들의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 특발성 폐섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 푸코잔틴은 전체 조성물 100 중량부에 대하여 0.1 중량부 내지 50 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 특발성 폐섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

사람을 제외한 동물에 푸코잔틴을 처리하는 단계를 포함하는, α -SMA, 콜라겐-1(Collagen-1) 및 피브로넥틴(fibronectin)의 발현량을 감소시키는 방법.

청구항 6

푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 함유하며, 폐섬유화증 표지 단백질인 α -SMA, 콜라겐-1(Collagen-1) 및 피브로넥틴(fibronectin)의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 특발성 폐섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 푸코잔틴은 전체 조성물 100 중량부에 대하여 0.1 중량부 내지 90 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 특발성 폐섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 함유하는 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폐는 공기의 들숨과 날숨을 통해 산소를 얻고 이산화탄소를 배출하는 인간의 호흡을 담당하는 필수적인 기관이다. 폐섬유화증은 이러한 중요한 폐의 기능을 악화시켜 목숨을 잃게 만들기도 하는 질환으로, 폐의 잦은 염증 재발에 의해 폐의 실질세포가 섬유화되어 점차 수축되면서 딱딱해지는 병증이다. 즉, 세균이나 바이러스 감염에 의해 일어나는 급성 염증(폐결핵, 감기, 독감, 신종플루 등)이 만성화되어 염증이 잔류하거나, 면역 활동에 영향을 미치는 교감 신경의 향진이 지속되어 자율 신경의 불균형과 함께 면역 활동 과잉으로 염증이 계속 발생하면서, 이러한 염증이 반복되어 발생하는 조직이 점차 딱딱하게 굳어져 폐섬유화증으로 진행하게 된다.

[0003] 현재로서는 이러한 폐섬유화증의 치료제로 염증을 억제하는 스테로이드를 사용하고 있지만, 이는 염증을 일시적

으로 억제하기만 할 뿐 이미 발생한 염증에 대해서는 치료 작용을 나타내지 못하며, 장기간 사용할 시에는 피부와 뼈가 약해지고 혈관이 변형되는 등의 다양한 부작용을 일으키는 문제점이 존재한다. 따라서 효과적으로 폐섬유화증을 치료할 수 있는 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

[0004] 한편, 푸코잔틴(Fucoxanthin)이라 불리는 화합물은 주로 미역, 모자반, 다시마, 톳 등의 해조류에 존재하는 물질로서 이들 해조류에서 갈색을 띠게 하는 주요 카로테노이드(carotenoid)에 속한다. 현재까지 푸코잔틴의 생리활성에 대해 진행된 연구들은 항암 효과(문헌[Das, S. K. et al., Biochim. Biophys. Acta., 2005, 1726(3):328-335]; [Kotake-Nara, E. et al., Cancer Lett. 2005, 220(1):75-84]; [Kotake-Nara, E. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2005, 69(1):224-227]; [Hosokawa M. et al., Biochim. Biophys. Acta, 2004, 1675(1-3):113-119]; [Kotake-Nara, E. et al., J. Nutr., 2001, 131(12):2921-2927]; [Okuzumi, J. et al., Cancer Lett., 1993, 68(2-3):159-168]; 및 [Okuzumi, J. et al., Cancer Lett., 1990, 55(1):75-78]), 항염증 효과 (문헌[Shiratori, K. et al., Exp Eye Res. 2005, 81(4):422-428]), 혈관신생 억제 효과 (문헌[Sugawara, T. et al., J. Agric. Food Chem. 2006, 54(26):9805-9810]), 항비만 효과 (문헌[Naeda, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, 332(2):392-397]) 등의 효과를 입증하였다. 하지만, 아직까지 푸코잔틴이 폐섬유화증의 예방 및 치료에 효과가 있다는 연구 결과는 아직까지 보고된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 제10-2014-0025914호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 특정 단백질의 발현 및 사이토카인의 분비를 억제함으로써 폐섬유화증을 치료 또는 예방할 수 있는 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 특정 단백질의 발현 및 사이토카인의 분비를 억제함으로써 폐섬유화증을 치료 또는 개선할 수 있는 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 함유하는 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 함유하는 폐섬유화증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, 푸코잔틴(Fucoxanthin)은 p38, AKT, smad2 및 smad3과 같은 효소들의 인산화를 억제하여 폐섬유화증의 표지 단백질들의 발현 및 IL-6 등의 사이토카인 분비를 억제하므로, 푸코잔틴을 유효성분으로 함유하는 조성물은 효과적인 폐섬유화증의 치료제로 유용하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 하나의 실시예에서 푸코잔틴의 세포독성을 측정한 결과이다.

도 2는 본 발명의 다른 하나의 실시예에서 푸코잔틴이 폐섬유화증 표지 단백질들의 발현을 억제하는 효과를 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명의 또 다른 실시예에서 푸코잔틴의 사이토카인 분비 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 또 다른 실시예에서 푸코잔틴이 효소의 인산화를 억제하는 효과를 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 또 다른 실시예에서 푸코잔틴이 smad2 및 smad3의 인산화를 억제하는 효과를 확인한

결과이다.

도 6은 본 발명의 또 다른 실시예에서 smad2/3 siRNA에 의한 폐섬유화증 표지 단백질 발현 및 사이토카인 분비 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 7은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 폐섬유화증 동물 모델에서 푸코잔틴의 염증세포의 침윤 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 8은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 폐섬유화증 동물 모델에서 푸코잔틴의 콜라겐-1(collagen-1) 발현 억제 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 함유하는 폐섬유화증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 푸코잔틴은 폐섬유화증 표지 단백질인 α -SMA, 피브로넥틴(fibronectin), 및 콜라겐-1(collagen-1)의 발현을 억제할 수 있었다. 이는 상기 푸코잔틴이 p38, AKT 및 smad2/3 등 효소의 인산화를 억제함으로써 상기 폐섬유화증 표지 단백질의 발현에 영향을 미치는 p39, AKT 및 smad2/3가 연관된 신호 전달 경로를 차단할 수 있기 때문이다.
- [0014] 즉, 상기 푸코잔틴은 폐섬유화증 표지 단백질인 α -SMA, 콜라겐-1(Collagen-1) 및 피브로넥틴(fibronectin)의 발현량을 감소시킬 수 있는 바, 구체적으로 p38, AKT, smad2 및 smad3의 인산화를 억제함으로써 폐섬유화증 표지 단백질들의 발현량을 감소시킬 수 있다.
- [0015] 이때, 상기 푸코잔틴은 전체 조성물 100 중량부에 대하여 0.1 중량부 내지 50 중량부로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는 1 중량부 내지 40 중량부로 포함될 수 있는 바, 푸코잔틴이 0.1 중량부 미만으로 포함되는 경우에는 푸코잔틴의 폐섬유화증 치료 효과를 효과적으로 나타낼 수 없고, 50 중량부를 초과하여 포함되는 경우에는 푸코잔틴의 함량 증가량 대비 치료효과의 증가량이 적고 제형상의 안정성이 저하되므로 바람직하지 않다.
- [0016] 상기 폐섬유화증은 특발성 폐섬유증일 수 있는 바, 상기 특발성 폐섬유증은 폐포 벽에 만성염증 세포들이 침투하면서 폐를 딱딱하게 하는 여러 변화가 발생하여 폐조직의 심한 구조적 변화를 야기하며 점차 폐기능이 저하되어 사망하게 되는 질환으로, 발병 원인을 알 수 없는 난치병으로 분류되어 뚜렷한 치료약이 없었으나, 본 발명에 따른 푸코잔틴 및 푸코잔틴을 포함하는 약학 조성물은 이 특발성 폐섬유증을 예방 또는 치료할 수 있는 효과를 나타낸다.
- [0017] 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0019] 경구 투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 푸코잔틴에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다.
- [0020] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만 당업

자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 푸코잔틴의 일일 투여량은 바람직하게는 0.01 mg/kg 내지 500 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0022] 더불어, 본 발명은 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 함유하는 폐섬유화증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0023] 이때, 상기 푸코잔틴은 전체 조성물 100 중량부에 대하여 0.1 중량부 내지 90 중량부로 포함될 수 있는 바, 상기 범위에서 가장 적절한 폐섬유화증 예방 또는 개선효과를 나타낼 수 있으므로 바람직하다.

[0024] 상기 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0025] 또한, 상기 건강기능식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0026] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0028] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 당업계에 있어 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이며, 본 발명의 내용을 예시하는 것이 뿐이므로 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0030] <준비예 1> 실험재료

[0031] 본 발명에 사용한 인간 재조합 TGF- β 는 R&D system(Minneapolis, MN)에서, 푸코잔틴(Fucoxanthin)은 시그마(Sigma; St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다. TGF- β 는 1 mg/ml의 소혈청 알부민이 포함된 4 mM의 멸균 염산에, 푸코잔틴은 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)에 각각 녹인 후 본 발명에 사용하기 위하여 완전 배지에 원하는 농도로 희석하여 사용하였다.

[0033] <준비예 2> 세포주 배양

[0034] Promo Cell(Germany)에서 구입한 인간 폐 섬유아세포(Human pulmonary fibroblast, HPF)는 섬유아세포 증식 배지 2(fibroblast growth medium 2; Promo Cell, Germany)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0036] <실시예 1> 세포독성 측정

[0037] HPF를 8×10^4 cell/mL로 96 웰 플레이트에 심은 후, 1 ng/mL의 TGF- β 처리 24시간 전에 혈청을 넣지 않은 배지로 교환하였다. 푸코잔틴은 TGF- β 처리 30분 전에 5, 10, 20 μ M의 농도로 배지에 넣어주었고, 이후 TGF- β 를 처리하고 24시간 경과 후에 흡광도 측정이 가능한 2-(4-이오도페닐)-3-(4-니트로페닐)-5-(2,4-디설포페닐)-2H-테트라졸리움 모노소듐염(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt; WST-1) kit에 나타난 방법에 따라, CCK-8(Dojindo, Kumamoto, Japan)를 넣고 2시간 후에 450 nm 파장에서 SpectraMax M2(Molecular Devices, CA)를 사용하여 흡광도를 측정 및 분석하였다.

[0038] 측정 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 세포에 처리된 푸코잔틴의 농도는 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0040] <실시예 2> 폐섬유화증 표지 단백질의 발현 억제 효과 측정

[0041] 푸코잔틴의 폐섬유화증 표지 단백질들의 발현 억제 효과를 측정하기 위하여, 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하였다. 구체적으로, 8×10^4 cell/mL의 HPF를 60 mm 디시 플레이트(dish plate)에 심은 후, 무혈청 배지 조건에서 1 ng/mL의 TGF- β 로 자극하기 전에 30분 동안 푸코잔틴을 5, 10, 20 μ M로 전처리하고, TGF- β 자극 후 24시

간 동안 배양하였다.

[0042] 이렇게 배양한 세포를 PBS로 세척 후 0.05% trypsin-EDTA(Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA)를 처리하여 세포를 떼어내 세포 용혈 버퍼(cell lysis buffer; Mammalian Cell-PE LB, G Biosciences, St. Louis, MO)를 이용하여 단백질을 추출하여 5분 동안 가열하였다. 동량의 단백질을 10% SDS 폴리아크릴아마이드 미니젤(polyacrylamide minigel)을 사용하여 분리시키고 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 막으로 옮긴 후 니트로셀룰로오스 막은 다음과 같은 1차 항체: α -SMA, 콜라겐-1(collagen-1; abcam, UK), 피브로넥틴(Fibronectin), P38(santa cruz biotechnology Inc, Texas USA), P-p38, P-AKT, T-AKT, P-smad2, T-smad2, P-smad3, t-smad3(cell signaling, MA USA) 및 GAPDH(Ab frontier, seoul Korea)로 4℃에서 밤새도록 반응시켰다. 이후 반응물을 TBS-0.1% 트윈(tween) 20으로 3번 세척하고 퍼록시다아제(oxidase)가 부착된 2차 항체: 항-토끼 또는 항-마우스(santa cruz biotechnology Inc, Texas USA) 항체로 실온에서 1시간 반응시킨 후 ECL 감지 시스템(detection system; Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA)을 사용하여 결과를 분석하였다.

[0043] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, TGF- β 에 의해 피브로넥틴, α -SMA 및 콜라겐-1의 단백질 발현이 증가했고, 푸코잔틴에 의해 농도 의존적으로 유의하게 그 발현이 감소했다.

[0045] <실시예 3> 사이토카인 발현 억제 효과 측정

[0046] 푸코잔틴의 사이토카인 분비 억제 효과를 측정하기 위해, 8×10^4 cell/mL의 HPF를 12 웰 플레이트에 심은 후, 무혈청 배지 조건에서 1 ng/mL의 TGF- β 로 자극하기 전에 30분 동안 푸코잔틴을 5, 10, 20 μ M의 농도로 전처리하고, TGF- β 로 자극 후 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 3000 rpm에 5분 원심분리 하여 얻은 상층액을 얻어 세포 밖으로 배출되는 IL-6의 농도를 측정하기 위하여 IL-6 ELISA kit(BioLegend ELISA kit, San Diego, CA)를 사용하여 키트 내의 사용방법에 따라 실험하였고, 450 nm의 파장에서 SpectraMax M2(Molecular Devices, CA)를 사용하여 상기 상층액의 흡광도를 측정하였다.

[0047] 그 결과가 도 3에 나타나 있는 바, 1 ng/mL의 TGF- β 의 자극에 의해 세포 밖으로 IL-6의 분비가 증가하였고, 푸코잔틴의 처리 농도에 비례하여 IL-6 분비량이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0049] <실시예 4> MAP 인산화 효소 및 AKT 인산화 억제 효과

[0050] 푸코잔틴의 MAP 인산화 효소 및 AKT의 인산화 억제 효과를 측정하기 위해, 8×10^4 cell/mL의 HPF를 12 웰 플레이트에 심은 후, 무혈청 배지 조건에서 1 ng/mL의 TGF- β 로 자극하기 전에 30분 동안 푸코잔틴을 5, 10, 20 μ M의 농도로 전처리하고, TGF- β 로 자극 후 1시간 및 16시간이 경과한 후의 각 세포에서 MAP 인산화 효소 슈퍼 패밀리에 속하는 p38 및 AKT의 인산화 신호전달 기전을 상기 실시예 2에서 수행한 웨스턴 블롯 방법으로 확인하였다.

[0051] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 1 ng/mL의 TGF- β 의 자극에 의해 세포 내 p38과 AKT가 인산화되었고 푸코잔틴의 처리농도에 의존적으로 p38과 AKT의 인산화를 억제하였다.

[0053] <실시예 5> smad 2/3 인산화 억제 효과

[0054] 푸코잔틴의 smad2/3의 인산화 억제 효과를 측정하기 위해 8×10^4 cell/mL의 HPF를 12 웰 플레이트에 심은 후, 무혈청 배지 조건에서 1 ng/mL의 TGF- β 로 자극하기 전에 30분 동안 푸코잔틴을 5, 10, 20 μ M의 농도로 전처리하고, TGF- β 로 자극 후 30분이 경과한 후의 세포를 이용하여, smad2/3의 인산화 신호 기전을 상기 실시예 2에서 수행한 웨스턴 블롯의 방법대로 확인하였다.

[0055] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 1 ng/mL의 TGF- β 의 자극에 의해 smad2와 smad3의 인산화가 촉진되었고, smad2의 인산화는 푸코잔틴 10, 20 μ M에서, smad3의 인산화는 푸코잔틴 20 μ M 농도에서 유의하게 감소하였다.

[0057] <실시예 6> Smad2/3 siRNA에 의한 피브로넥틴, α -SMA, 콜라겐-1 발현 및 IL-6 분비 억제 효과 측정

[0058] smad2/3 siRNA에 의한 폐섬유화증 표지 단백질의 발현 및 사이토카인 억제 효과를 측정하기 위하여 8×10^4 cell/mL의 HPF를 6 웰 플레이트에 심은 후, 20 및 40 nM의 smad2/3 siRNA(santa cruz biotechnology Inc, Texas USA)가 포함된 100 μ l의 형질주입 배지(transfection medium; santa cruz biotechnology Inc, Texas USA)와 6 μ l의 형질주입 시약(transfection reagent; santa cruz biotechnology Inc, Texas USA)이 포함된 100 μ l의 형질주입 배지(transfection medium)를 섞어 세포에 넣어주었다. 6시간 경과 후 2배의 소태아혈청(Fetal bovine serum, FBS)이 포함된 1 mL의 섬유아세포 증식 배지 2(broblast growth medium 2; Promo Cell,

Germany)를 넣어주어 15시간 배양하고, 무혈청배지 환경에서 1 ng/mL의 TGF- β 로 자극 후 다시 24시간 동안 배양하였다.

[0059] 이렇게 배양된 세포에서 α -SMA, 콜라겐-1 및 피브로넥틴 항체를 사용하여 상기 실시예 2에서 수행한 웨스턴 블롯 방법으로 단백질의 발현을 확인하였고, 세포의 배양액으로부터 상기 실시예 3에서 수행한 방법대로 IL-6 ELISA kit를 사용하여 IL-6의 분비량을 확인하였다.

[0060] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 smad2/3의 유전자 siRNA를 형질 주입한 세포로의 폐섬유화증 표지 단백질들(α -SMA, 콜라겐-1, 피브로넥틴)의 발현과 IL-6의 분비량이 유의하게 감소하였다. 즉, 이러한 결과와 상기 실시예 2 내지 5의 결과를 함께 고려해보면, 푸코잔틴이 p38 및 AKT의 인산화를 저해함으로써 신호 전달 과정을 억제하고, 그에 따라 폐섬유화증 표지 단백질들의 발현 및 IL-6의 분비를 저해함으로써 효과적인 폐섬유화증 치료 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

[0062] <실시예 7> 폐섬유화증 동물 모델에서의 효과 측정

[0063] ICR 마우스는 각 그룹당 세 마리, 총 네 그룹으로 나누어 실험하였다. 1 mg/kg의 블레오마이신을 마우스의 기도 내 주사한 후 6일째부터 10 mg/kg의 푸코잔틴을 복강 내에 매일 8일 동안 주사하였다. 대조군 마우스에는 푸코잔틴을 주사하지 않았다. 이후 블레오마이신을 주사하고 14일이 경과된 마우스의 폐조직을 염색하였다. 즉, 마우스에서 얻어진 폐조직을 4%의 파라포름알데히드에서 4℃에서 24시간 동안 고정하였다. 고정된 조직은 파라핀 침투를 위해 조직 프로세서(tissue processor; Leica biosystem)를 거친 후 임베딩 시스템(embedding system, Leica biosystem)에서 파라핀 블록으로 만든 후, 마이크로톰(microtome, Leica biosystem)을 이용하여 4 mm 두께의 절편으로 슬라이드에 붙여 헤마톡실린(hematoxylin; Sigma, USA)과 에오신(Eosin; Sigma, USA)이 포함된 자동 슬라이드 스테이너(automated slide stainer; Vision biosystem)에서 H&E 염색하고 Vectamount permanent mounting medium(Vector, USA)을 떨어뜨려 가상 현미경(virtual microscope; Nanozoomer 2.0, Hamamatsu, Japan)을 통해 관찰하였다.

[0064] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 블레오마이신만을 처리한 대조군 마우스의 폐에서는 염증성 세포의 침투로 인해 폐포 내에 세포가 가득 차 있지만, 푸코잔틴을 복강 주사한 마우스의 폐에서는 염증세포의 침윤이 억제됨을 확인하였다.

[0066] <실시예 8> 폐섬유화증 동물 모델에서의 콜라겐-1 발현 억제 효과 측정

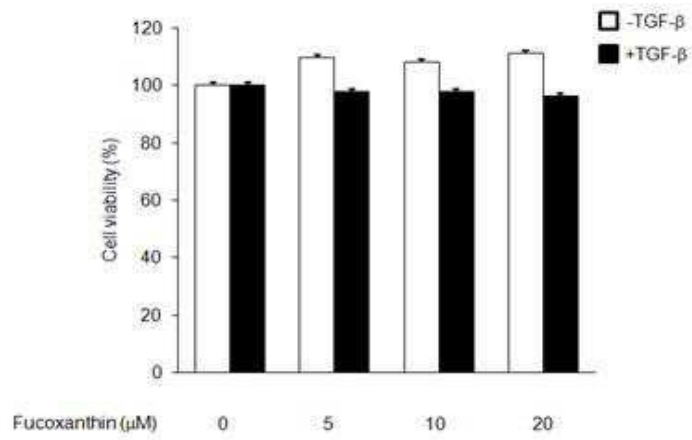
[0067] 상기 실시예 7에서 수행한 방법과 같이, ICR 마우스에 1 mg/kg의 블레오마이신을 기도 내 주사하고 6일 후부터 8일간 매일 10 mg/kg의 푸코잔틴을 복강주사 하였다. 대조군 마우스에는 푸코잔틴을 주사하지 않았다. 블레오마이신의 주사 후 14일째 되는 날에 마우스의 폐조직을 추출하여 4% 파라포름알데히드에 고정하고 파라핀 블록을 만들어 4 mm의 두께로 잘라 폐조직 절편을 제조하였다. 이 폐조직 절편을 슬라이드에 붙이고 타겟 회수 용액(Target retrieval solution; Dako, CA, USA)으로 121℃에서 5분 동안 멸균기에서 반응시켰다. 이후, PBS로 수세하고 퍼록시데이즈 블로킹 용액(peroxidase-blocking solution; Dako, Ca, USA)으로 상온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 다시 PBS로 세 번 수세한 후, 5 mg/ml의 콜라겐-1(abcam, UK) 항체를 4℃에서 밤새도록 반응시키고, 한 번 수세한 후 1:1000으로 희석한 이차 항체인 항-마우스 IgG(santa cruz biotechnology Inc, Texas USA)를 처리하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 폐조직 절편을 DAB substrate kit(Abcam, UK)를 이용하여 염색하고 헤마톡실린으로 반대 색깔 염색(카운터 염색)한 후 탈수화를 거쳐 Vectamount permanent mounting medium(Vector, USA)을 떨어뜨려 가상 현미경(virtual microscope; Nanozoomer 2.0, Hamamatsu, Japan)을 통해 관찰하였다.

[0068] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 블레오마이신만을 주사한 대조군 마우스의 폐에서는 콜라겐-1의 발현량이 높았지만, 블레오마이신 주사 후 푸코잔틴을 투여한 마우스의 폐에서는 콜라겐-1의 발현이 억제된 것을 확인할 수 있었다.

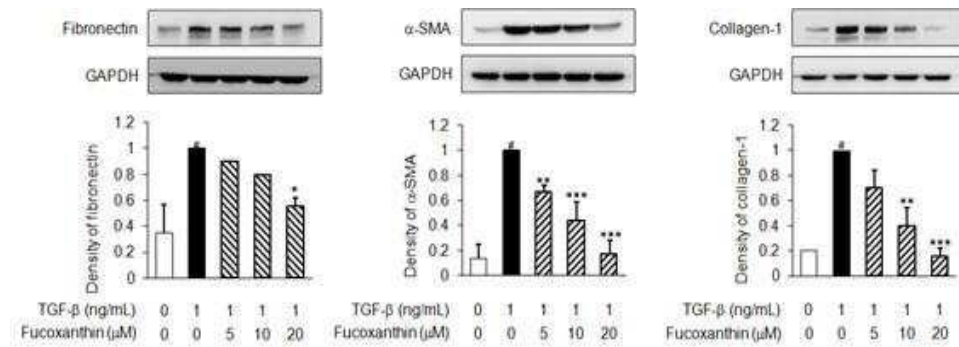
[0070] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

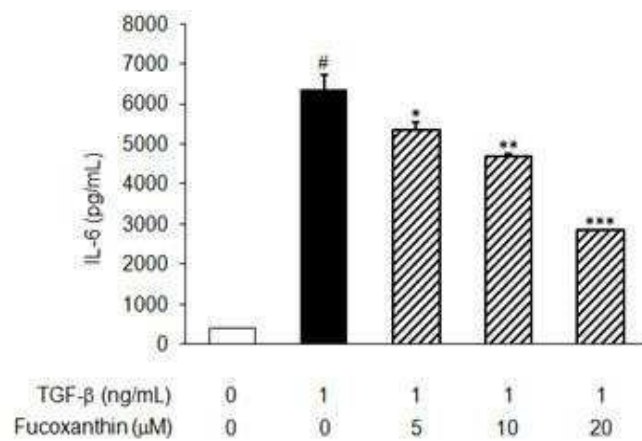
도면1



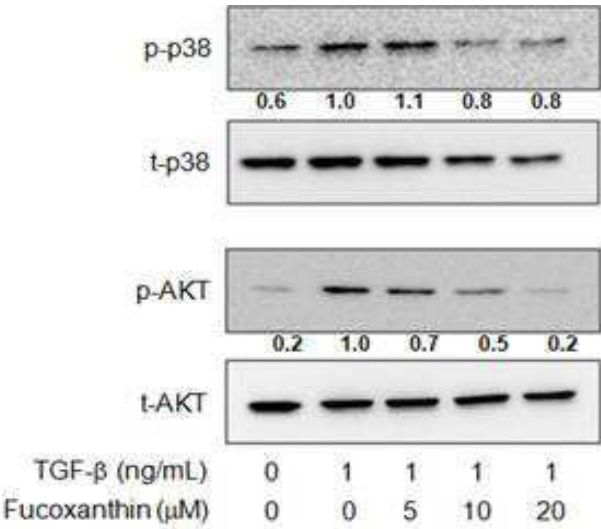
도면2



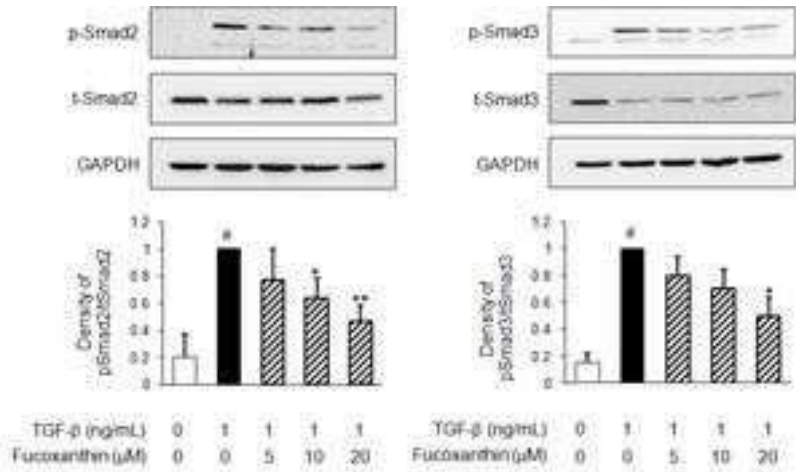
도면3



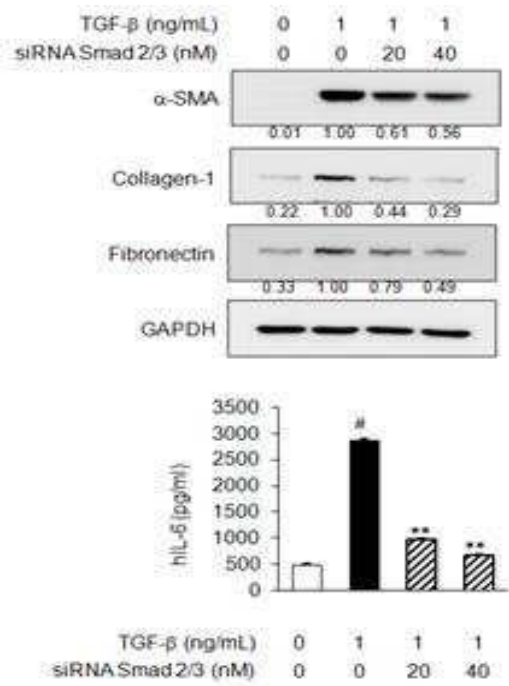
도면4



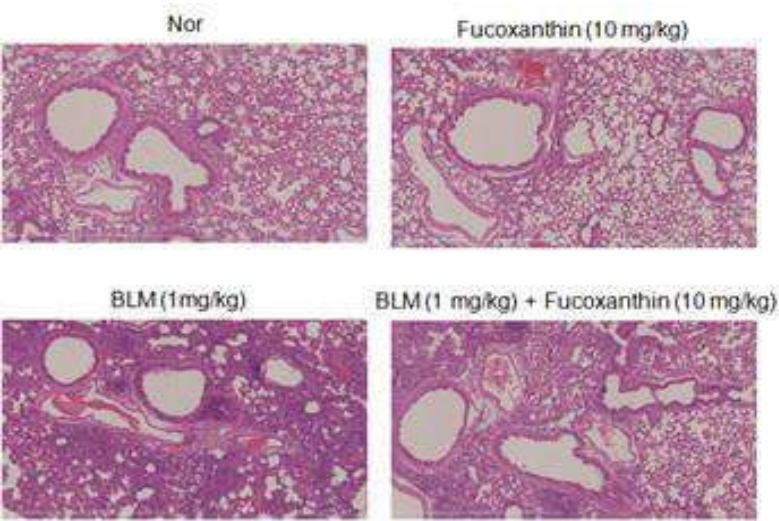
도면5



도면6



도면7



도면8

